



TITLE:

Novel hybrid three-dimensional artificial liver using human induced pluripotent stem cells and a rat decellularized liver scaffold(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Minami, Takahito

CITATION:

Minami, Takahito. Novel hybrid three-dimensional artificial liver using human induced pluripotent stem cells and a rat decellularized liver scaffold. 京都大学, 2020, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2020-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22302>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	南 貴人
論文題目	Novel hybrid three-dimensional artificial liver using human induced pluripotent stem cells and a rat decellularized liver scaffold (ヒト iPS 細胞とラット脱細胞化肝臓骨格を用いた新たなハイブリッド人工肝臓の構築)		
(論文内容の要旨)			
<p>現在、肝移植は末期肝不全に対する唯一の根治的治療法であるが、深刻な臓器ドナー不足が世界的に問題となっており、人工肝臓の開発などの代替療法の確立が求められている。しかし、生体肝臓の複雑な 3 次元構造の再現が困難であるため、移植可能なヒト人工肝臓の開発は現在に至るまで実現できていない。本論文では、肝臓本来の複雑な 3 次元構造や細胞外基質 (extracellular matrix; ECM) を保持した脱細胞化肝臓骨格とヒト iPS 細胞 (human induced pluripotent stem cells; hiPSCs) を用いた新たなハイブリッド 3 次元人工肝臓モデルを作製し、その肝機能を評価することを目的とした。</p> <p>まず、ラット肝から脱細胞化技術を用いて肝臓に特異的な ECM を保持した脱細胞化肝臓骨格を作製した。クリスタルバイオレットを用いた染色で脱細胞化肝臓骨格内の門脈構造と胆管構造が維持されていることを確認した。次に、マトリゲルでコーティングしたディッシュ上で hiPSCs に段階的な分化誘導をかけ、SOX17 陽性胚体内胚葉細胞や alpha-fetoprotein 陽性肝芽細胞様細胞を経て albumin (ALB) 陽性の hiPSCs 由来肝細胞様細胞 (hiPSC-derived hepatocyte-like cells; hiPSC-HLCs) を作製した。1.6×10⁷個の hiPSC-HLCs を経胆管的に脱細胞化肝臓骨格に注入 (再細胞化) した。この再細胞化された肝臓骨格に循環ポンプを用いて培地を灌流する循環培養を培養庫内 (37℃, 5%CO₂) で 48 時間施行し、その後の組織像や肝機能についての評価を行った。</p> <p>48 時間の循環培養後、肉眼的に hiPSC-HLCs は再細胞化肝臓骨格の肝葉内に広く分布していた。組織像では hiPSC-HLCs は血管構造を閉塞することなく再細胞化肝臓骨格の実質腔に分布しており、核や細胞質といった細胞構造が維持された hiPSC-HLCs が肝細胞様に索状に配列していた。循環培養後の hiPSC-HLCs の機能を蛍光免疫染色や逆転写ポリメラーゼ連鎖反応で評価したところ ALB や CYP3A4 の発現を認めた。また、ELISA 法による測定で循環培養後の培地中にヒト ALB が分泌されていることを確認した。</p> <p>本論文では、hiPSCs とラット脱細胞化肝臓骨格を用いて作製したハイブリッド 3 次元人工肝臓モデルがヒトの肝機能を有していることを報告した。これは hiPSCs を用いてヒト肝機能を有する再細胞化人工肝臓モデルを報告した初めての論文である。脱細胞化組織は異種由来であっても免疫原性が低いことが報告されており、本研究は肝不全患者自身の自己 hiPSCs を利用した免疫拒絶のない移植可能な人工肝臓の開発に向けた第一歩である。</p>			

<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>現在、iPS 細胞等を用いた再生医療研究において肝臓本来の複雑な 3 次元構造を再現した人工肝臓の開発は未だ成し遂げられていない。申請者は、複雑な 3 次元構造や細胞外基質を保持した脱細胞化肝臓骨格とヒト iPS 細胞 (hiPSCs) を用いたハイブリッド 3 次元人工肝臓を作製し、その機能を評価することを目的として研究を行った。</p> <p>2 次元培養で hiPSCs から分化誘導を経て作製した hiPSCs 由来肝細胞様細胞 (hiPSC-HLCs)を用いて、ラット肝から作製した脱細胞化肝臓骨格を再細胞化した。再細胞化された肝臓骨格を循環回路につないで培地を灌流しながら培養し、その後の組織像や肝機能についての評価を行った。</p> <p>培養後の組織像では hiPSC-HLCs は再細胞化肝臓骨格の実質腔に分布しており、肝組織様に索状に配列していた。蛍光免疫染色や逆転写ポリメラーゼ連鎖反応での評価で albumin や CYP3A4 の発現を認め、ELISA 法による測定で循環培養後の培地中にヒト albumin タンパクが分泌されていることを確認した。</p> <p>以上より、hiPSCs と脱細胞化肝臓骨格を用いて作製したハイブリッド 3 次元人工肝臓において、生着した hiPSC-HLCs が一部の肝細胞機能を有していることが確認された。</p> <p>以上の研究は、将来的な自己由来 hiPSCs を用いた人工肝臓の可能性を示唆するものであり、今後のヒト人工肝臓開発の研究に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は 博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和元年 11 月 6 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			